

猪苗代湖・裏磐梯周辺水系における水棲生物生息調査ならびに
メダカの遺伝学的解析

漆谷 博志

会津大学短期大学部研究紀要 第 80 号抜刷

2023 年 3 月

猪苗代湖・裏磐梯周辺水系における水棲生物生息調査ならびに メダカの遺伝学的解析

漆谷 博志[※]

【要旨】 人間による様々な活動は、環境を通して多様な生き物の健康や生態系に好ましくない影響を及ぼす場合がある。特に水棲生物に対する影響が危惧されており、水系におけるリスク評価の指標生物として、メダカ (*Oryzias latipes*) が用いられている。また、従来から日本に生息するメダカは絶滅の危険が増大している。そこで、本研究では猪苗代湖・裏磐梯周辺水系におけるメダカを中心とした水棲生物の生息調査を行った。さらに、採取されたメダカのミトコンドリア遺伝子を用いた RFLP 法による遺伝学的解析をあわせて行うことで、本地域におけるメダカの現状把握を行った。今回の生息調査ならびに遺伝学的解析の結果から、猪苗代湖・裏磐梯周辺水系における様々な水棲生物の生息状況、ならびに裏磐梯水系における北日本集団に属する遺伝子型のメダカの存在が明らかとなった。以上の結果より、メダカの生息する裏磐梯水系の保全のためには、裏磐梯水系を利用した伝統的文化の保護などを通じた、在来水棲生物の生息場所の安定的確保が必要であると考えられる。また、猪苗代湖・裏磐梯周辺水系におけるメダカを中心とした水棲生物のさらなる生息調査、ならびにその調査結果等を用いた啓発活動などによる水環境保護をあわせて行うことが重要であると考えられる。

[※] 会津大学短期大学部食物栄養学科准教授

1 はじめに

人間による様々な活動は、環境を通して多様な生き物の健康や生態系に好ましくない影響を及ぼす場合がある。これを環境リスクと呼び、様々な調査研究が行われている。特に水系に生息する生物への影響が危惧されており、そのような水系におけるリスク評価の指標生物として、メダカ (*Oryzias latipes*) が用いられている (田中, 2012)。メダカはダツ目メダカ科の小型淡水魚で、日本全域から朝鮮半島、中国大陸などに広く分布し、比較的流れの穏やかな水域に生息している (酒泉, 2000a、竹花・酒泉, 2002、川瀬, 2019)。しかし、近年の都市化や外来種の侵入などによる生息環境の変化等により生息地が減少し、現在では絶滅の危険が増大している種 (絶滅危惧Ⅱ類 (VU) (環境省レッドリスト 2020)) に分類されている (環境省, 2020)。これまでのメダカの遺伝学的研究により、日本における遺伝的集団として大きく北日本集団と南日本集団に分けられることが報告されている (竹花・酒泉, 2002、Takehana ら, 2003)。さらに、現在では日本に由来から生息するメダカを、北日本集団をキタノメダカ (*O. sakaizumii*)、南日本集団をミナミメダカ (*O. latipes*) と遺伝的に異なるグループとして区別している (Asai ら, 2011、Asai, 2016、川瀬, 2019)。このようなメダカの遺伝学的分類を行う方法として、アロザイム解析法やミトコンドリア DNA (mtDNA) におけるチトクロム b 遺伝子 (Cytb) を用いた制限酵素断片長多型 (RFLP) 法が用いられている (酒泉, 2000b、竹花・酒泉, 2002、Takehana ら, 2003)。特に、北日本集団のメダカは 20 種類の遺伝子型 (マイトタイプ) に分類されている (Takehana ら, 2003)。このようなメダカ在来種の遺伝的背景が明らかになる一方で、環境教育や自然保護活動等としてメダカの人為的放流が各地で行われ、在来種との遺伝的交雑が起こる“遺伝子汚染”などの問題が危惧されている (竹花・北川, 2010)。

現在までに、猪苗代町や会津若松市周辺においてもメダカ mtDNA Cytb 遺伝子を用いた RFLP 法による解析が行われており、3 種類の北日本集団に属するマイトタイプの存在が報告されている (Takehana ら, 2003)。猪苗代湖や裏磐梯周辺水系における更なるメダカの生息分布や遺伝学的調査を行うことは、この地域におけるメダカなどの淡水魚類の生態系における環境リスクや生態系形成を類推する上で重要な情報となりうると同時に、市販されているヒメダカや、地域外からのメダカの持ち込みによる遺伝子汚染の有無を検証する上でも有用であると考えられる。そこで、本研究では猪苗代湖・裏磐梯周辺水系におけるメダカを中心とした水棲生物の生息調査と、採取されたメダカ mtDNA Cytb 遺伝子の RFLP 法による遺伝学的解析を行った。

2 材料および方法

2.1 水棲生物の生息調査および採取

猪苗代湖・裏磐梯周辺水系におけるメダカの生息調査ならびに採取は 2020 年 7 月～8 月にかけて行った。採取方法として、タモ網ならびにセル瓶を用いた。メダカの採取にあたっては、国内のメダカ在来種保護のために 1 採取地あたり 2 個体までの採取とした。また、メダカ保護の観点から、生息地についての詳細な情報は記載しないこととした。採取された個体 (3 地点、計 6 個体) については、購入した市販ヒメダカ 2 個体とあわせて 100%エタノールで固定し、遺伝子解析用サンプルとして会津大学短期大学部にて保存した。

2.2 PCR-RFLP 法によるミトコンドリア Cytb 遺伝子解析

遺伝子解析用サンプルのメダカ尻ビレより、Qiagen Blood&Tissue kit (Qiagen社) を用いて全 DNA 抽出を行い、PCR法によりメダカCytb遺伝子を含む領域を増幅した。メダカCytb遺伝子を含む領域の遺伝子断片 (約1.2kb) の増幅は、Cytb Fa (5'-AGG ACC TGT GGC TTG AAA AAC CAC-3') とCytb RVa

(5'-TYC GAC YYC CGR WTT ACA AGA CCG-3') (Takehanaら, 2003) のプライマーセットを用い、iCyclerサーマルサイクラー(Bio-Rad社)により行った。PCR法による増幅は、LA Taqポリメラーゼ (TaKaRa Bio社) 製品付属の一般的反応条件 (終濃度: 1XBuffer, 2.5mM MgCl₂, 0.4mM dNTPs, 0.05U LA Taq) に、鋳型DNAとしてメダカ尻ビレから抽出した全DNA200ng、CytbFaとCytbRVa各プライマーを各0.5 μMを加え、50 μlの系で反応を行った。PCR条件は、95°C 300秒間の熱変性を行った後、95°Cで30秒、60°Cで60秒、72°Cで120秒の反応を30サイクル行い、さらに72°Cで600秒の伸長反応を行った。増幅後の遺伝子断片は、Nucleospin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL社) により精製した後、制限酵素処理によるRFLP法に用いた。RFLP法を行う際に用いた4種類の制限酵素 (*HaeIII*, *MspI*, *MboI*, *RsaI*) は、各制限酵素の最適条件で反応を行った。制限酵素による処理後、6%ポリアクリルアミドゲル、1XTBEバッファーを用いて電気泳動を行い、CybrGreenIによる染色ならびに可視光LED励起光下での観察と写真撮影を行った。なお、DNAサイズマーカーとして、50 bp DNA Ladderおよびφ x174-*HaeIII* digest (Takara Bio社) を使用した。電気泳動により得られた遺伝子パターンは、Takehanaら (2003) の報告と比較し、採取された個体のマイトタイプとした。

3 結果

3.1 水棲生物の生息調査

猪苗代湖・裏磐梯水系における水棲生物生息調査の結果、それぞれ調査地点で様々な水棲生物を観察することが出来た。

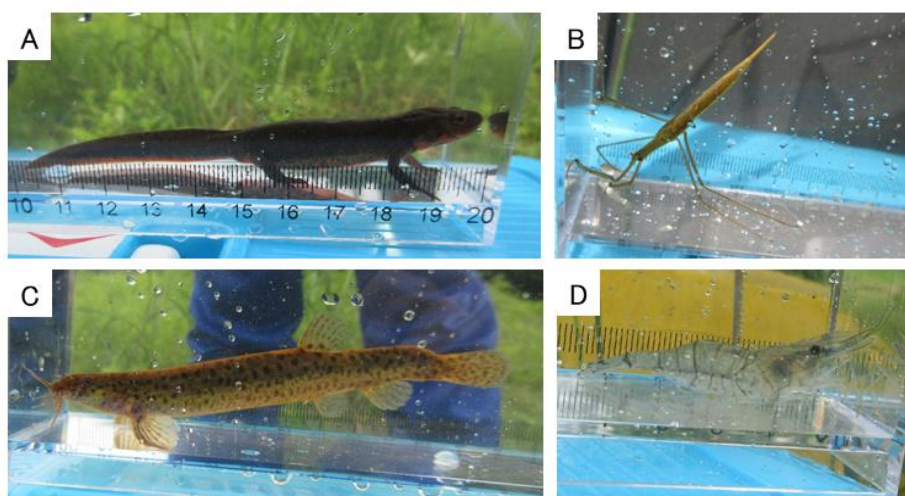


図1 猪苗代湖周辺水系で観察された水棲生物

猪苗代湖周辺水系 (猪苗代町内用水路、猪苗代湖周辺 (天神浜、中田浜付近)) では、両生類 (イモリ (図1A) ・アマガエル)、魚類 (ドジョウ (図1C) ・トウヨシノボリ・タナゴ・タモロコ・アブラハヤなど)、水生昆虫 (ミズカマキリ (図1B) ・コオイムシ・マツモムシ・ヤゴ (オオヤマトンボ))、甲殻類 (スジエビ (図1D) ・アメリカザリガニ) などの水棲生物が確認できた。しかしながら、この調査域内でメダカを採取することはできなかった。

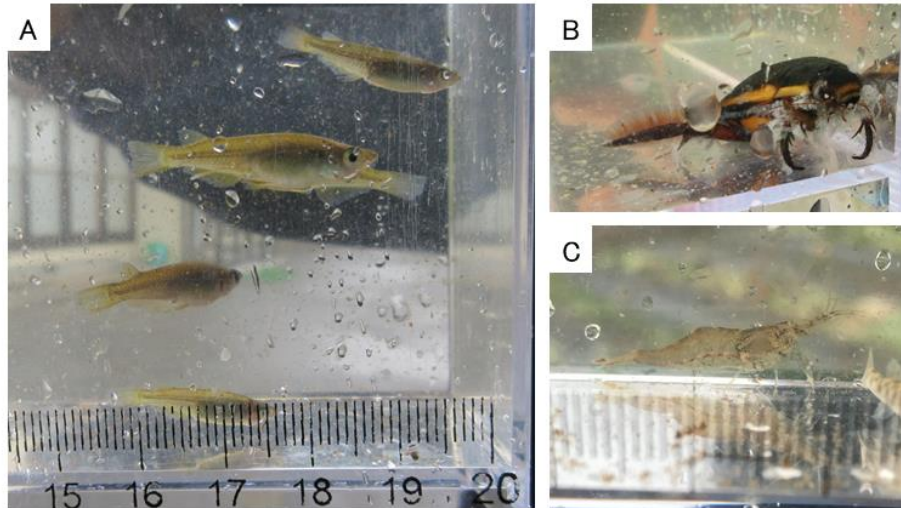
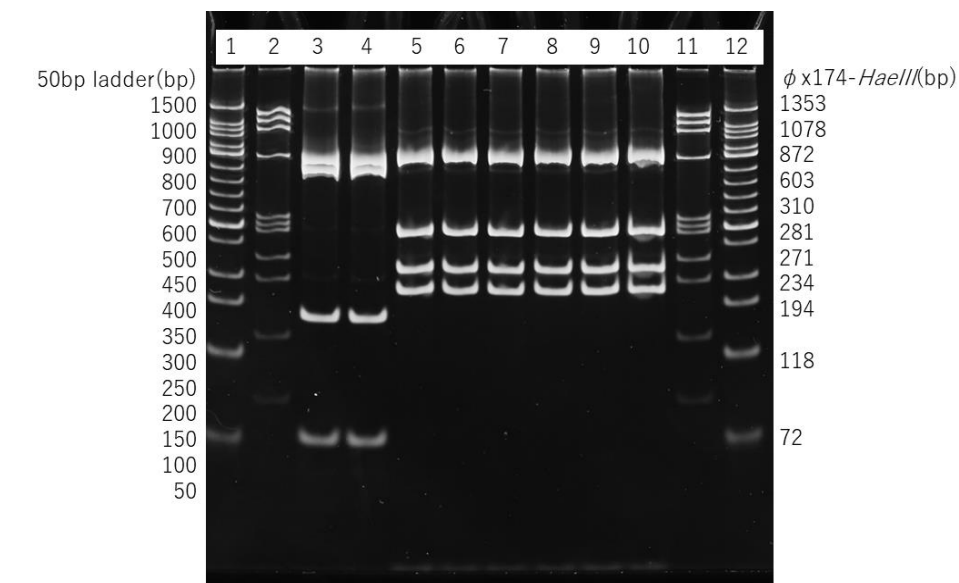


図2 裏磐梯水系で観察された水棲生物

次に裏磐梯水系（北塩原村桧原・裏磐梯地区周辺）における水棲生物調査の結果、魚類（メダカ（図2A）・タモロコ・ウキゴリ）、水生昆虫（ゲンゴロウ（図2B））、甲殻類（ヌカエビ（図2C））などが確認できた。なお、メダカについては3地点で生息が確認できたため、各地点2個体ずつ採取し、以降の遺伝子解析に用いた。

3.2 PCR-RFLP法によるメダカmtDNA Cytb遺伝子解析

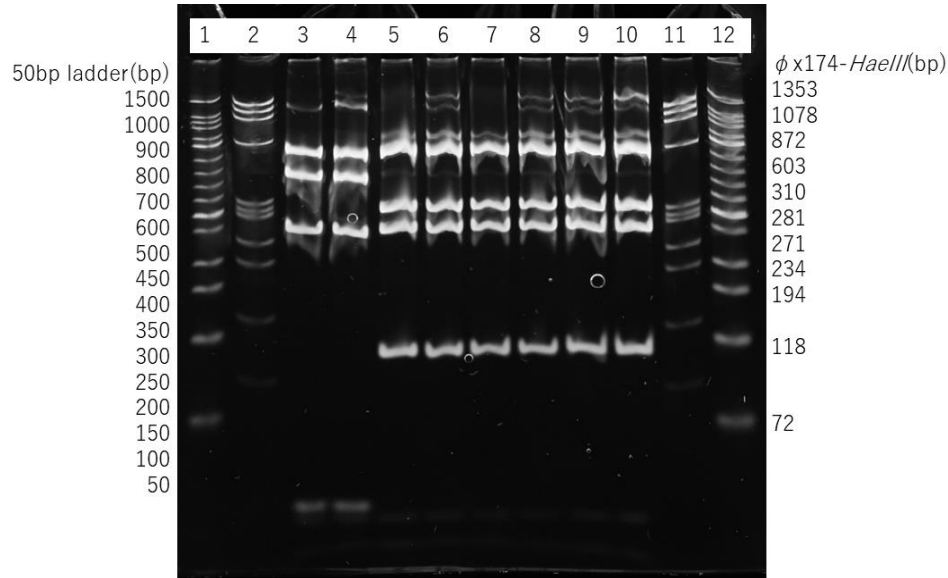
裏磐梯水系で採取されたメダカ（野生メダカ、6個体）と、ヒメダカの人為的放流による遺伝子汚染の有無の比較検討を行うため、会津若松市内で購入したヒメダカ（2個体）から全DNAを抽出し、PCR-RFLP法により解析を行った。



1, 12 : DNAサイズマーカー（50bp DNA ladder）、2, 11 : DNAサイズマーカー（ ϕ x174-*HaeIII* digest）、3, 4: ヒメダカPCR産物、5-10: 野生メダカPCR産物。

図3 *HaeIII*処理後のPCR産物解析

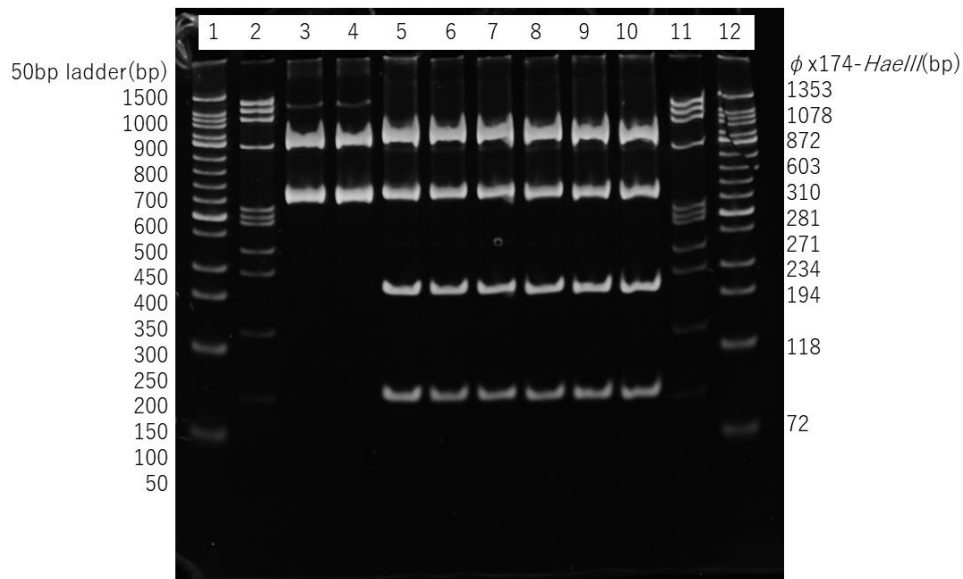
*HaeIII*処理による遺伝子断片とDNAサイズマーカーとの比較より、約550bp、約280bp、約220bp、約170bpと推定される明瞭なバンドが観察された（図3）。以上の電気泳動結果から、このタイプを示す型として最も近いものはA型と推定された。



1, 12 : DNAサイズマーカー（50bp DNA ladder）、2, 11 : DNAサイズマーカー（ ϕ x174-*HaeIII* digest）、3, 4 : ヒメダカPCR産物、5-10: 野生メダカPCR産物。

図4 *MspI*処理後のPCR産物解析

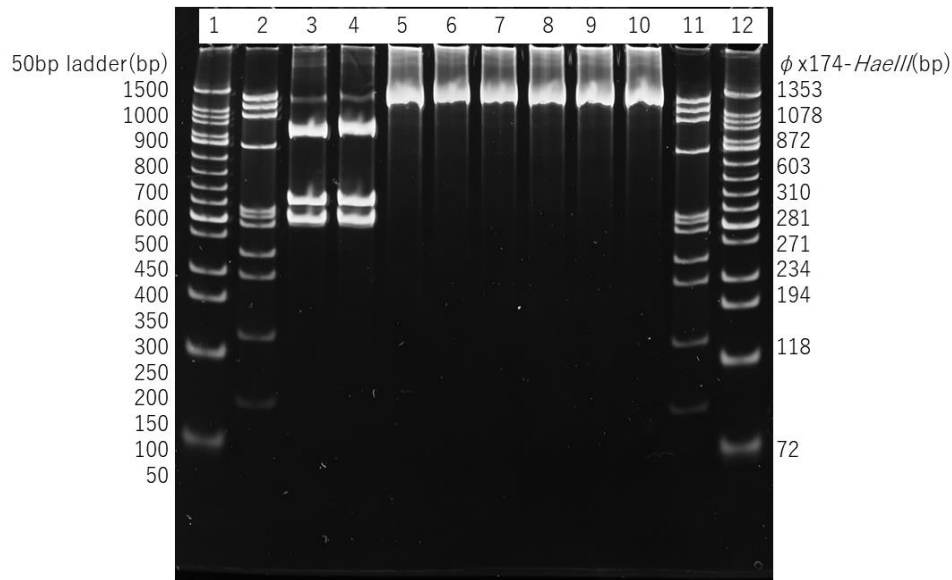
次に、*MspI*処理による遺伝子断片とDNAサイズマーカーとの比較より、約550bp、約320bp、約260bp、約90bpと推定される明瞭なバンドが観察された（図4）。以上の電気泳動結果から、このタイプを示す型として最も近いものはA型と推定された。



1, 12 : DNAサイズマーカー（50bp DNA ladder）、2, 11 : DNAサイズマーカー（ ϕ x174-*HaeIII* digest）、3, 4 : ヒメダカPCR産物、5-10: 野生メダカPCR産物。

図5 *MboI*処理後のPCR産物解析

次に、*MboI*処理による遺伝子断片とDNAサイズマーカーとの比較より、約650bp、約370bp、約180bp、約80bpと推定される明瞭なバンドが観察された(図5)。以上の電気泳動結果から、このタイプを示す型として最も近いものはA型と推定された。



1, 12 : DNAサイズマーカー (50bp DNA ladder)、2, 11 : DNAサイズマーカー (ϕ x174-*HaeIII* digest)、3, 4: ヒメダカPCR産物、5-10: 野生メダカPCR産物。

図6 *RsaI*処理後のPCR産物解析

次に、*RsaI*処理による遺伝子断片とDNAサイズマーカーとの比較より、約1200bpと推定される明瞭なバンドが観察された(図6)。以上の電気泳動結果から、このタイプを示す型として最も近いものはA型と推定された。

以上の4種類の制限酵素処理による遺伝子断片の解析結果より、裏磐梯水系で採取された野生メダカ6個体のmtDNA *Cytb*遺伝子構成はAAAA型となることから、今回採取されたいずれの個体も北日本集団に属するマイトタイプA1であることが確認された。なお、ヒメダカPCR産物の各制限酵素処理による遺伝子断片の解析結果から、mtDNA *Cytb*遺伝子構成はPFEE型となり、マイトタイプB27であることが推定された。

4 考察

今回の調査研究より、裏磐梯水系に生息するメダカのマイトタイプは、A1型であることが明らかとなった。マイトタイプA1は、青森県から京都府に至る本州の日本海側に広く分布している遺伝的集団であり、これまでに猪苗代町ならびに会津若松周辺でも存在が確認されている(竹花・酒泉, 2002、Takehanaら, 2003)。今回の調査結果からも、裏磐梯に生息するメダカはこれに類するものと予想される。また、ヒメダカの分析結果と比較したところ、遺伝子交雑と思われる遺伝子パターンは観察されなかったことから、これらの6個体はいずれも北日本集団に属するメダカ在来種であることが推測された。

本調査研究により明らかとなったことに、メダカの生息状況の地域差がある。今回の調査では、猪苗代湖周辺でメダカが確認できなかったのに対し、裏磐梯水系では、限られた範囲ではあるものの、メダカの個体数が維持されている箇所が認められた。これらの地域差に対する影響の一つとして、人

為的環境開発が考えられる。猪苗代湖周辺地域は山で囲まれており、猪苗代湖と山との間の狭い平野部を居住と農作地にあてねばならず、必然的に人間が利用しやすい水路・圃場整備などが行われることとなる。整備の結果として、流れが速く水草などが生えない水路や、設備維持のために農繁期以外は水を入れない水路が増加する。また、ため池などはブラックバスやブルーギルなどの外来種が侵入し他魚種等を捕食するなど、在来魚種が生息しにくい環境となっている。これらのことが複合的に影響し、猪苗代湖周辺ではメダカは生息数や生息域を減らしているものと推測された。全国のメダカ生息地においても、これらと同様の要因による影響が以前から懸念されている（細谷, 2000、竹花・北川, 2010、環境省, 2014）。一方、裏磐梯水系におけるメダカの生息地は、ジュンサイの栽培等に用いられた整備された場所であった。これらの場所では栽培等に適した水を山から引いており、また他の池とは水の行き来が乏しく、水草が繁茂して流れが緩やかであった。裏磐梯水系のメダカがどのように生息域を広げてきたのかは今後のさらなる研究が必要であるが、生息地を管理されている地域の方から、少なくとも50年以上前から現在のような環境が維持されており、メダカも生息しているとの話を伺えた。2つの地域におけるメダカの生息状況は、人間の関与の違いにより大きく異なっていると推察される。

今回の調査ならびに遺伝学的解析の結果から、猪苗代湖・裏磐梯周辺水系における様々な水棲生物の生息状況、ならびに北日本集団に属する遺伝子型のメダカの存在が明らかとなった。今後の課題として、今回得られたメダカmtDNA Cytb遺伝子配列の決定と、調査地域を拡大した猪苗代湖・裏磐梯周辺水系におけるメダカの生息・遺伝学的分布解析、および地域環境の変遷を併せて考察することで、本調査地域における水棲生物の生態系形成の一側面を論じることが可能となると考える。なお、会津周辺地域におけるメダカの環境DNA等を用いた最近の研究より、同地域周辺でのメダカの遺伝的交雑や人為的放流についても報告されてきている（福島県立葵高等学校, 2021）。今後の裏磐梯水系の利用法によりメダカの生息状況も変わる可能性があるが、裏磐梯水系を利用した伝統的文化保護と、このような調査研究等を通じた地域住民や観光客等に対する啓発活動による環境保護を併せて行うことが、本地域における水棲生物生態系維持に重要であると考えられる。

参考文献

- [1] 川瀬成吾. 2019. ダツ目メダカ科. 細谷和海（編）. 山溪ハンディ図鑑 15 増補改訂日本の淡水魚. pp. 326-331. 山と溪谷社. 東京.
- [2] 環境省. 2014. 第4次レッドリスト. キタノメダカ:
https://ikilog.biodic.go.jp/rdbdata/files/envpdf/%E6%B1%BD%E6%B0%B4%E3%83%BB%E6%B7%A1%E6%B0%B4%E9%AD%9A%E9%A1%9E_147.pdf. (参照 2022-12-21) .
- [3] 環境省. 2020. レッドリスト 2020. <https://www.env.go.jp/press/107905.html>. 別添資料3【汽水・淡水魚類】:15. (参照 2022-12-21) .
- [4] 酒泉満. 2000a. メダカはどういう生き物か. 水環境学会誌. 23(3): 130-134.
- [5] 酒泉満. 2000b. メダカの系統と種内構造. 蛋白質核酸酵素. 45(17): 2909-2917.
- [6] 竹花祐介・北川忠生. 2010. メダカ: 人為的な放流による遺伝的攪乱. 魚類学雑誌. 57(1): 76-79.
- [7] 竹花祐介・酒泉満. 2002. メダカの遺伝的多様性の危機. 遺伝, 56(6): 66-71.
- [8] 田中嘉成. 2012. 環境汚染の生態リスクを定量的に評価する. 国立環境研究所ニュース, 31(4): 4-7.

- [9] 福島県立葵高等学校 会津メダカから見る遺伝的攪乱の研究 ～ご当地メダカを救え～ 中谷医工計測技術振興財団 科学教育振興助成 2021年度実績. <https://www.nakatani-foundation.jp/wp-content/uploads/0cb3815cb250cab2c4f5e84823a97233-1.pdf>. (参照2022-12-21) .
- [10] 細谷和海. 2000. メダカの生息状況と保護. 水環境学会誌. 23(3): 135-139.
- [11] Asai, T. 2016. Taxonomic revision of *Oryzias latipes* complex, “Medaka” in Far-East Asia. Jpn. J. Environ. Toxicology, 19 (1) :1-7.
- [12] Asai, T., H. Senou, and K. Hosoya. 2011. *Oryzias sakaizumii*, a new ricefish from northern Japan (Teleostei: Adrianichthyidae) . Ichthyol. Explor. Freshwaters, 22(4) :289-299.
- [13] Takehana, Y., Nanai, N., Matsuda, M., Tsuchiya, K., and Sakaizumi, M. 2003. Geographic Variation and Diversity of the Cytochrome b Gene in Japanese Wild Populations of Medaka, *Oryzias latipes*. Zoological Science, 20(10):1279-1291.

謝辞

本研究の水棲生物生息調査に協力いただいた会津大学短期大学部食物栄養学科・安藤弥生さん、及川風さん、太田咲妃さん、大竹梨々花さん、滝晟弥さん、円谷麗奈さん、丸山万喜さん、弓田さくらさん、吉岡歩美さんにお礼申し上げます。また、同調査の遂行にあたりご助力いただきました北塩原村桧原・裏磐梯地区の関係者の皆様と、宗像亮様にお礼申し上げます。

本研究は、2020年度「きらめく水のふるさと磐梯」湖美来基金水環境保全活動支援事業の援助を受けて実施されました。また、本稿は上記事業報告書の内容に加筆修正したものです。